

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/019714

International filing date: 22 December 2004 (22.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2003-425009
Filing date: 22 December 2003 (22.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 17 February 2005 (17.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

22.12.2004

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2003年12月22日
Date of Application:

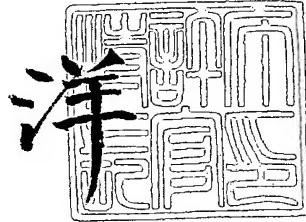
出願番号 特願2003-425009
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP2003-425009]

出願人 北海道ティー・エル・オー株式会社
Applicant(s):

2005年2月3日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



出証番号 出証特2005-3006359

【書類名】 特許願
【整理番号】 PHT-0003
【提出日】 平成15年12月22日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 A61K 39/00
【発明者】
 【住所又は居所】 北海道札幌市南区澄川5条5丁目10番17号
 【氏名】 西村 孝司
【発明者】
 【住所又は居所】 愛媛県松山市石手3丁目8-4
 【氏名】 安川 正貴
【特許出願人】
 【識別番号】 800000024
 【氏名又は名称】 北海道ティー・エル・オー株式会社
【代理人】
 【識別番号】 230104019
 【弁護士】
 【氏名又は名称】 大野 聖二
 【電話番号】 03-5521-1530
【選任した代理人】
 【識別番号】 100106840
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 森田 耕司
 【電話番号】 03-5521-1530
【選任した代理人】
 【識別番号】 100105991
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 田中 玲子
 【電話番号】 03-5521-1530
【選任した代理人】
 【識別番号】 100114465
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 北野 健
 【電話番号】 03-5521-1530
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 185396
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲**【請求項1】**

非特異的な抗腫瘍活性をもつT_h細胞を誘導する工程と、そのT_h細胞に抗原特異性を付与するための工程とを含むことを特徴とする、細胞治療用の細胞の製造方法。

【請求項2】

T_h細胞に抗原特異性を付与するための工程が、癌関連抗原を認識するTCRの遺伝子を導入することにより行われる、請求項1記載の細胞治療用の細胞の製造方法。

【請求項3】

T_h細胞に抗原特異性を付与するための工程が、癌関連抗原を認識するクラスI拘束性TCRの遺伝子を導入することにより行われる、請求項1記載の細胞治療用の細胞の製造方法。

【請求項4】

T_h細胞に抗原特異性を付与するための工程が、癌関連抗原を認識するクラスII拘束性TCRの遺伝子を導入することにより行われる、請求項1記載の細胞治療用の細胞の製造方法。

【請求項5】

癌関連抗原が、WT1、CEA、AFP、CA19-9、CA125、PSA、CA7-2-4、SCC、MK-1、MUC-1、p53、HER2、G250、gp-100、MAGE、BAGE、SART、MART、MYCN、BCR-ABL、TRP、LAG-E、GAGEおよびNY-ESO1からなる群より選択される、請求項2-4のいずれかに記載の細胞治療用の細胞の製造方法。

【請求項6】

非特異的な抗腫瘍活性をもつT_h細胞を誘導する工程が、T細胞を含む材料を、抗CD3抗体およびIL-2の存在下で培養することにより行われる、請求項1記載の細胞治療用の細胞の製造方法。

【請求項7】

抗原特異性を付与されたT_h細胞を精製する工程をさらに含む、請求項1-6のいずれかに記載の細胞治療用の細胞の製造方法。

【請求項8】

抗原特異性を付与されたT_h細胞を精製する工程が、抗体磁気ビーズを使用することにより行われる、請求項7記載の細胞治療用の細胞の製造方法。

【請求項9】

非特異的な抗腫瘍活性をもつT_h1細胞とT_c1細胞を誘導する工程と、そのT_h1細胞とT_c1細胞に抗原特異性を付与するための工程とを含むことを特徴とする、細胞治療用の細胞の製造方法。

【請求項10】

T_h1細胞とT_c1細胞に抗原特異性を付与するための工程が、癌関連抗原を認識するTCRの遺伝子を導入することにより行われる、請求項9記載の細胞治療用の細胞の製造方法。

【請求項11】

T_h1細胞とT_c1細胞に抗原特異性を付与するための工程が、癌関連抗原を認識するクラスI拘束性TCRの遺伝子を導入することにより行われる、請求項9記載の細胞治療用の細胞の製造方法。

【請求項12】

T_h1細胞とT_c1細胞に抗原特異性を付与するための工程が、癌関連抗原を認識するクラスII拘束性TCRの遺伝子を導入することにより行われる、請求項9記載の細胞治療用の細胞の製造方法。

【請求項13】

癌関連抗原が、WT1、CEA、AFP、CA19-9、CA125、PSA、CA7-2-4、SCC、MK-1、MUC-1、p53、HER2、G250、gp-100、

MAGE、BAGE、SART、MART、MYCN、BCR-ABL、TRP、LAG-E、GAGEおよびNY-ESO1からなる群より選択される、請求項9-12のいずれかに記載の細胞治療用の細胞の製造方法。

【請求項14】

非特異的な抗腫瘍活性をもつTh1細胞とTc1細胞を誘導する工程が、T細胞を含む材料を、抗CD3抗体、IL-2、およびIL-12の存在下で培養することにより行われる、請求項9記載の細胞治療用の細胞の製造方法。

【請求項15】

抗原特異性を付与されたTh1細胞とTc1細胞とを分離する工程をさらに含む、請求項9-14のいずれかに記載の細胞治療用の細胞の製造方法。

【請求項16】

抗原特異性を付与されたTh1細胞とTc1細胞とを分離する工程が、抗体磁気ビーズを使用することにより行われる、請求項15記載の細胞治療用の細胞の製造方法。

【請求項17】

分離されたTh1細胞とTc1細胞を任意の割合で混合する工程をさらに含む、請求項15または16に記載の細胞治療用の細胞の製造方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】改変標的化T細胞の製造方法及び医薬

【技術分野】

【0001】

本発明は、非特異的に活性化した抗腫瘍活性を有するT_h細胞またはT_h1細胞およびT_c1細胞に、腫瘍抗原を特異的に認識するT細胞レセプターの遺伝子を導入することからなる、特異的に腫瘍細胞を傷害しうる活性化T細胞医薬の製造方法と応用に関する。

【背景技術】

【0002】

本特許において癌とは悪性新生物をいい、また癌と腫瘍は、同義として扱うものとする。

【0003】

末梢血より分離した単核球をインターロイキン-2 (IL-2) 存在下で培養することにより、ナチュラルキラー (NK) 細胞抵抗性の腫瘍に対して幅広く抗腫瘍活性をもつリンフォカイン活性化キラー (Lymphokine Activated Killer、LAK) 細胞を誘導することができる（例えば、非特許文献1参照）。その後、遺伝子組み換え技術により大量のIL-2が入手可能となり（例えば、非特許文献2参照）、腫瘍に対するLAK細胞を用いた養子免疫療法の臨床応用がなされ、その有用性が示された（例えば、非特許文献3参照）。

【0004】

さらにIL-2に抗CD3モノクローナル抗体 (MoAb) を加えて培養することにより、少量の末梢血から得られた単核球よりLAK活性をもつ細胞を大量に培養することができる（例えば、非特許文献4参照）。

【0005】

末梢のTリンパ球は細胞表面にT細胞レセプター (TCR) と共にCD3分子を発現しており、CD4またはCD8分子の発現の違いにより、ヘルパーT (Th) 細胞または細胞傷害性T細胞 (CTL) に分類される。

【0006】

細胞表面に発現した分子（たとえばCD4分子、CD8分子）に対するMoAbと磁気ビーズを用いることにより、目的の細胞表面抗原有する細胞を濃縮または除去することができる（例えば、特許文献1参照）。

【0007】

Th細胞はインターフェロン- γ (IFN- γ)、IL-2などのサイトカインを産生するTh1細胞と、IL-4、IL-10などのサイトカインを産生するTh2細胞に分けられ（例えば、非特許文献5参照）、Th1細胞は細胞性免疫のエフェクターとして働き、Th2細胞は体液性免疫の調節を担っている。またTh1細胞が産生するIFN- γ はTh2細胞を抑制し、Th2細胞が産生するIL-4はTh1細胞を抑制する（例えば、非特許文献6参照）。

【0008】

初期のTh細胞活性化の際にIL-12の存在によりTh1細胞の分化が起こり（例えば、非特許文献7参照）、IL-4の存在によりTh2細胞の分化が起こる（例えば、非特許文献8参照）。

【0009】

一方、CTLは、Th1細胞およびTh2細胞と同様のサイトカイン産生パターンにより、Tc1細胞とTc2細胞とに分類される。Tc1細胞は強力な細胞傷害性を示し、Tc2細胞は免疫抑制的作用を担っており、IL-12またはIL-4の存在によりTc1細胞またはTc2細胞へ分化する（例えば、非特許文献9参照）。

【0010】

T細胞はTCRによりMHC分子／抗原ペプチド複合体を認識して、抗原提示細胞 (APC) などの標的細胞に結合するが、CTLはMHCクラスI分子／抗原ペプチドの複合

体のみに結合し（MHCクラスI拘束性）、Th細胞はMHCクラスII分子／抗原ペプチドの複合体のみしか結合できない（MHCクラスII拘束性）とされている。

【0011】

また、MHCクラスI分子はほとんどの有核細胞に発現しているが、MHCクラスII分子は限られた一部の細胞しか発現していない。このためTh細胞はMHCクラスII分子を発現した樹状細胞やB細胞、活性化T細胞などとは結合できるが、これら以外の腫瘍細胞や感染細胞などには直接結合することができない。

【0012】

しかし遺伝子操作によってMHCクラスI拘束性とされるCTL由来のTCR遺伝子を導入したMHCクラスII拘束性とされるCD4陽性CD8陰性T細胞が、対応抗原をパルスしたAPCとCD8非依存的に反応して活性化されることができ、対応抗原に結合できるTCRを発現していることが示された。また、非特異的な抗腫瘍活性をもつ末梢血リンパ球に腫瘍抗原特異的CTL由来のTCR遺伝子を導入することにより、特異的に腫瘍を傷害することができる（例えば、非特許文献10参照）。

【特許文献1】特許番号 第2530966号

【非特許文献1】Grimmら, 1982. J. Exp. Med., 155:182
3-1841

【非特許文献2】Taniguchiら, 1983. Nature, 302:305
-310

【非特許文献3】Rosenbergら, 1985. New Engl. J. Med.
313:1485-1492

【非特許文献4】Ochoaら, 1987. J. Immunol., 138:272
8-2733

【非特許文献5】Mosmannら, 1986. J. Immunol., 136:2
348-2357

【非特許文献6】Maggiら, 1992. J. Immunol., 148:214
2-2147

【非特許文献7】Sederら, 1993. Proc. Natl. Acad. Sci.
USA, 90:10188-10192

【非特許文献8】Hsiehら, 1992. Proc. Natl. Acad. Sci.
USA, 89:6065-6069

【非特許文献9】Mosmannら, 1996, Immunology Today,
17:138-146

【非特許文献10】Morganら, 2003. J. Immunol., 171:3
287-3295

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

生体外で腫瘍特異的T細胞を誘導するためには、手術によって患者本人の腫瘍組織を得る必要がある。また最近では腫瘍抗原ペプチドを用いた腫瘍特異的T細胞の誘導が可能となっているが、限られたタイプのMHCを有する患者しか適応できない。

【0014】

さらに腫瘍特異的T細胞を誘導するためには、多くの手間と時間さらには誘導に使用するAPCを得るために大量の血液を必要とし、細胞治療に必要な量の腫瘍特異的T細胞を得るのは困難である。

【0015】

したがって、本発明は、腫瘍特異的T細胞、特にTh細胞あるいはT_h1細胞とT_c1細胞を製造するための新規な方法を提供することを目的とする。

【0016】

さらに、MHCクラスI分子はほとんどの有核細胞に発現するが、MHCクラスII分子

子は活性化した細胞を含む一部の細胞にしか発現していないため、ヘルパーT細胞は全ての細胞に直接結合できるわけではない。

【0017】

したがって、本発明は、MHCクラスI分子に結合しうる腫瘍特異的ヘルパーT細胞、特にTh1細胞を製造するための新規な方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0018】

本発明者らは、非特異的な抗腫瘍活性をもつTc1細胞に腫瘍特異的TCR遺伝子を導入することにより、腫瘍細胞を特異的に傷害しうる細胞に加工できることを見い出した。さらに非特異的に活性化したMHCクラスII拘束性のTh1細胞に、MHCクラスI拘束性の抗原特異的CTLより得られたTCR遺伝子を導入することにより、MHCクラスI分子／抗原ペプチド複合体と反応できるヘルパー活性さらには抗腫瘍活性を有する細胞に加工できることを見い出した。

【0019】

本発明は、非特異的な抗腫瘍活性をもつTh細胞を誘導する工程と、そのTh細胞に抗原特異性を付与するための工程とを含むことを特徴とする、細胞治療用の細胞の製造方法を提供する。好ましくは、T細胞に抗原特異性を付与するための工程は、癌関連抗原を認識するTCRの遺伝子を導入することにより行われる。また好ましくは、Th細胞に抗原特異性を付与するための工程は、癌関連抗原を認識するクラスI拘束性TCRの遺伝子を導入することにより行われる。また好ましくは、Th細胞に抗原特異性を付与するための工程は、癌関連抗原を認識するクラスII拘束性TCRの遺伝子を導入することにより行われる。

【0020】

別の態様においては、本発明は、非特異的な抗腫瘍活性をもつTh1細胞とTc1細胞を誘導する工程と、そのTh1細胞とTc1細胞に抗原特異性を付与するための工程とを含むことを特徴とする、細胞治療用の細胞の製造方法を提供する。好ましくは、T細胞に抗原特異性を付与するための工程は、癌関連抗原を認識するTCRの遺伝子を導入することにより行われる。また好ましくは、Th1細胞とTc1細胞に抗原特異性を付与するための工程は、癌関連抗原を認識するクラスI拘束性TCRの遺伝子を導入することにより行われる。また好ましくは、Th1細胞とTc1細胞に抗原特異性を付与するための工程は、癌関連抗原を認識するクラスII拘束性TCRの遺伝子を導入することにより行われる。

【0021】

本発明の方法において、好ましくは、癌関連抗原は、WT1、CEA、AFP、CA19-9、CA125、PSA、CA72-4、SCC、MK-1、MUC-1、p53、HER2、G250、gp-100、MAGE、BAGE、SART、MART、MYCN、BCR-ABL、TRP、LAGE、GAGEおよびNY-ESO1からなる群より選択される。

【0022】

別の態様においては、本発明の方法において、非特異的な抗腫瘍活性をもつTh細胞を誘導する工程は、患者の末梢血などから採取したT細胞を含む材料を、抗CD3抗体、IL-2の存在下で培養することにより行われる。

【0023】

別の態様においては、本発明の方法において、非特異的な抗腫瘍活性をもつTh1細胞とTc1細胞を誘導する工程は、患者の末梢血などから採取したT細胞を含む材料を、抗CD3抗体、IL-2、およびIL-12の存在下、好ましくは抗CD3抗体、IL-2、IL-12および抗IL-4抗体の存在下、さらに好ましくは抗CD3抗体、IL-2、IL-12、抗IL-4抗体およびIFN- γ の存在下で培養することにより行われる。

【0024】

別の態様においては、本発明の方法は、抗原特異性を付与されたT h細胞を精製する工程をさらに含む。好ましくは、抗原特異性を付与されたT h細胞を精製する工程は、抗体磁気ビーズを使用することにより行われる。

【0025】

別の態様においては、本発明の方法は、抗原特異性を付与されたT h1細胞とT c1細胞とを分離する工程をさらに含む。好ましくは、抗原特異性を付与されたT h1細胞とT c1細胞とを分離する工程は、抗体磁気ビーズを使用することにより行われる。

【0026】

別の態様においては、本発明の方法は、分離されたT h1細胞とT c1細胞を任意の割合で混合する工程をさらに含む。

【発明を実施するための最良の形態】

【0027】

本発明の細胞治療用の細胞の製造方法は、非特異的な抗腫瘍活性をもつT h細胞を誘導する工程と、そのT h細胞に抗原特異性を付与するための工程とを含む。

【0028】

非特異的な抗腫瘍活性をもつT h細胞は、以下のようにして誘導することができる。ヒトの末梢血から比重遠心法等の方法により回収した単核球を、抗CD3抗体、IL-2の存在下に、培地（AIM-V：インビトロジェン社、ヒトAB型血清、培養細胞と同一血液型、好ましくは自己血清を0.1～30%、好ましくは5～10%）で培養する。IL-2の終濃度は10～2000IU/ml、好ましくは50～500IU/mlである。このようにして、抗原非特異的に活性化したT h細胞を誘導することができる。

【0029】

別の態様においては、本発明の細胞治療用の細胞の製造方法は、非特異的な抗腫瘍活性をもつT h1細胞とT c1細胞を誘導する工程と、そのT h1細胞とT c1細胞に抗原特異性を付与するための工程とを含む。

【0030】

非特異的な抗腫瘍活性をもつT h1細胞とT c1細胞は、以下のようにして誘導することができる。ヒトの末梢血から比重遠心法等の方法により回収した単核球を、抗CD3抗体、IL-2、およびIL-12の存在下、好ましくは抗CD3抗体、IL-2、IL-12および抗IL-4抗体の存在下、さらに好ましくは抗CD3抗体、IL-2、IL-12、抗IL-4抗体およびIFN- γ の存在下で培養するの存在下に、培地（AIM-V：インビトロジェン社、ヒト血清添加：AB型血清、培養細胞と同一血液型、好ましくは自己血清を0.1～30%、好ましくは5～10%）で培養する。各サイトカインの好ましい濃度は、終濃度で、IL-2については、10～2000IU/ml、好ましくは50～500IU/mlであり、IL-12については、1～1000IU/ml、好ましくは10～200IU/mlであり、IFN- γ については、1～500ng/ml、好ましくは5～100ng/mlであり、抗IL-4抗体については、0.1～100 μ g/ml、好ましくは0.5～10 μ g/mlである。このようにして、抗原非特異的に活性化したT h1細胞とT c1細胞を誘導することができる。

【0031】

次に、このようにして得られた非特異的な抗腫瘍活性をもつT h細胞あるいはT h1細胞およびT c1細胞に、腫瘍細胞に対する抗原特異性を付与する。T h細胞あるいはT h1細胞およびT c1細胞に抗原特異性を付与するための工程は、癌関連抗原を認識するTCRの遺伝子を導入して、TCRをそのT h細胞あるいはT h1細胞およびT c1細胞表面上で発現させることにより行う。TCRは、クラスI拘束性TCRであっても、クラスII拘束性TCRであってもよい。

【0032】

TCR遺伝子は、腫瘍特異的なヒトCTLクローニングから単離することができる。腫瘍特異的なCTLクローニングは、ヒトから単離したT細胞を限界希釈することによりクローニングしてもよく、あるいはヒトから単離したCTLをインビトロで抗原の存在下で培養する

ことにより誘導してもよい。T C R 遺伝子は、T C R α 鎖遺伝子およびT C R β 鎖遺伝子に特異的な配列に対応するプライマーを用いて、5' RACE法によりそれ容易にクローニングすることができる。

【0033】

T C R 遺伝子は、種々のウイルスベクターを用いてT細胞に導入することができる。このようなベクターとしては、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、センダイウイルスベクター、リポソーム等が挙げられる。ベクターは、T細胞中でT C R 遺伝子が発現されるような様式で配列された、プロモーター領域、開始コドン、終止コドンおよびターミネーター領域等を含む。T C R 遺伝子を組み込んだウイルスベクターは、適宜パーケージングプラスミド、ヘルパープラスミド等を利用して、上述の抗原非特異的に活性化したT細胞に導入することができる。このようにして、腫瘍細胞に対する特異性を付与されたT h 細胞、T h 1 細胞およびT c 1 細胞を得ることができる。

【0034】

本発明の好ましい態様においては、抗原非特異的に活性化したT細胞として、M H C クラス I I 拘束性であるT h 細胞を用い、これに腫瘍特異的C T LのT C R 遺伝子を導入することにより、クラス I 拘束性のT C R を発現して直接腫瘍細胞に結合しうるT h 細胞を製造することができる。このようなT h 細胞は、抗腫瘍活性とヘルパー活性との両方を有するため、癌の治療において用いるのに非常に有用である。特に好ましくはT h 細胞はT h 1 細胞である。

【0035】

さらに、上述のようにして得られた活性化T細胞の集団において、抗原特異性を付与されたT h 細胞を精製してもよい。この工程は、CD 4 抗体を結合した磁気ビーズを使用して抗原特異性を有するCD 4 陽性細胞を単離することにより行うことができる。

【0036】

また、上述のようにして得られた活性化T細胞の集団において、抗原特異性を付与されたT h 1 細胞とT c 1 細胞とを分離してもよい。この工程は、CD 4 またはCD 8 抗体を結合した磁気ビーズを使用して、抗原特異性を有するCD 4 陽性細胞またはCD 8 陽性細胞を単離することにより行うことができる。このようにして分離されたT h 1 細胞とT c 1 細胞とは、癌の治療において、最適な効果が得られるように任意の割合で混合することができる。

【0037】

本発明の方法により得られた抗原特異性を付与されたT h 細胞、T h 1 細胞およびT c 1 細胞の抗原特異性は、以下のようにして評価することができる。H L A がわかっているヒト末梢血单核球をE B ウィルスによりトランスフォームしてリンフォblast細胞株（L C L）を得る。この培養液に、目的とする抗原の当該H L A 拘束性ペプチドを添加することにより、ペプチドパルスを行う。この操作により細胞表面に当該H L A / 抗原ペプチド複合体が発現したL C L 細胞が得られる。次に、マイトイシンC処理して不活性化したペプチドパルスL C L 細胞、または対照としてペプチドパルスしていないL C L 細胞と、本発明の方法により得られた抗原特異性を付与されたT h 細胞、T h 1 細胞またはT c 1 細胞とを共培養する。培養上清中のI F N - γ またはI L - 2 の量を測定して比較することにより、抗原特異性を測定することができる。

【0038】

また、本発明の方法により得られた抗原特異性を付与されたT h 細胞、T h 1 細胞またはT c 1 細胞の抗腫瘍活性は、T細胞を 51 C r 標識したペプチドパルスL C L 細胞と一定時間接触させ、放出される 51 C r の量を測定することにより評価することができる。

【0039】

以下に本発明の実施例を示すが、本発明はこれらの実施例に限定されない。

【実施例1】

【0040】

TCR遺伝子を含有するウイルスベクターの作製

H L A - A 2 4 陽性健常人由来の腫瘍抗原 W T 1 を有する腫瘍に特異的な C T L クローン T A K - 1 から、 5' R A C E 法により T C R α 鎖遺伝子と T C R β 鎖遺伝子を単離し、 配列を同定した。

【0041】

H L A - A 2 4 陽性健常人 C T L 由来の W T 1 特異的な T C R α 鎖遺伝子と T C R β 鎖遺伝子をレンチウイルスベクター C S I I に組み込み大腸菌株 D H 1 0 B に導入後、 増殖させたベクターを C a C 1 2 遠心法により精製した。

【0042】

培養中の 2 9 3 T 細胞に H L A - A 2 4 陽性健常人 C T L 由来の W T 1 特異的な T C R α 鎖遺伝子、 T C R β 鎖遺伝子を組み込んだレンチウイルスベクター C S I I をパッケージングプラスミド p M D L g / p R R E 、 R e v 発現プラスミド p R V S - R e v 、 V S V - G プラスミド p M D . G と共に加えてさらに培養し、 フォルスコリン処理後に該 T C R α 鎖遺伝子、 T C R β 鎖遺伝子を組み込んだレンチウイルスベクターを多量に含む培養上清を回収した。

【実施例2】

【0043】

T細胞の非特異的活性化

あらかじめ、 抗 C D 3 抗体を培養プレートに固相化させた抗 C D 3 抗体固相化プレートを準備しておき、 末梢血から比重遠心法により回収した单核球を、 1 0 0 I U / m l の I L - 2 、 5 0 I U / m l の I L - 1 2 、 1 0 n g / m l の I F N - γ 、 2 μ g / m l の抗 I L - 4 抗体（タイプ1サイトカイン）を加えたタイプ1培養条件で培養した。

【実施例3】

【0044】

TCR遺伝子を導入したT細胞の調製

タイプ1培養条件で2日間培養した单核球に、 実施例1で得られたレンチウイルスベクターを含む培養上清とタイプ1サイトカインとを加えて培養し、 さらにこの24時間後にもレンチウイルスベクターを含む培養上清とタイプ1サイトカインを加えて培養することにより、 非特異的に活性化したT細胞に H L A - A 2 4 陽性健常人 C T L 由来の W T 1 特異的な T C R α 鎖遺伝子と T C R β 鎖遺伝子を導入した。

【0045】

さらに10日間培養して、 H L A - A 2 4 陽性健常人 C T L 由来の W T 1 特異的な T C R α 鎖遺伝子と T C R β 鎖遺伝子を導入した活性化T細胞を増殖させた。

【0046】

H L A - A 2 4 陽性健常人 C T L 由来の W T 1 特異的な T C R α 鎖遺伝子と T C R β 鎖遺伝子を導入し、 タイプ1培養条件で非特異的に活性化したT細胞を市販の M A C S マイクロビーズ C D 4 または M A C S マイクロビーズ C D 8 （ミルテニー・バイオテック社）を用いて C D 4 陽性T細胞（ T h 1 細胞）または C D 8 陽性T細胞（ T c 1 細胞）をそれぞれ単離した。

【実施例4】

【0047】

TCR遺伝子を導入したT細胞の抗腫瘍活性の評価

ヒトの M H C クラス I 抗原の中で日本人に最も高い頻度で存在する H L A - A 2 4 陽性の健常人の末梢血单核球を E B ウィルスによりトランスフォームして得られた H L A - A 2 4 陽性リンフォblast細胞株（ L C L ）を仮想腫瘍細胞とし、 W T 1 タンパク質の H L A - A 2 4 拘束性ペプチドを 1 0 μ g / m l の濃度で添加し 1 6 時間反応（ペプチドをパルス）させた後、 未反応のペプチドを洗浄した。 この操作により細胞表面に H L A - A 2 4 / W T 1 ペプチド複合体が発現した L C L 細胞が得られる。

【0048】

実施例3で精製した T h 1 細胞（ W T 1 - A 2 4 T C R + T h 1 細胞）または T c 1 細

胞（WT 1-A24 TCR+Tc1細胞）を、WT 1ペプチドをパルスしたLCL細胞またはパルスしないLCL細胞をマイトイシンC処理して不活性化したいずれかと24時間の共培養した後、培養上清中のIFN- γ とIL-2の量を測定した。

【0049】

その結果、WT 1-A24 TCR+Th1細胞とWT 1-A24 TCR+Tc1細胞のいずれにおいても、WT 1ペプチドをパルスしたLCL細胞との共培養によりIFN- γ の産生が見られたが、ペプチドをパルスしないLCL細胞との共培養によってはIFN- γ の産生は見られなかった（図1）。

【0050】

また、IL-2の産生はWT 1ペプチドをパルスしたLCL細胞と共培養した場合はWT 1-A24 TCR+Th1細胞では見られたものの、WT 1-A24 TCR+Tc1細胞ではTh1細胞と比べ低かった。ペプチドをパルスしないLCL細胞との共培養によってはWT 1-A24 TCR+Th1細胞、WT 1-A24 TCR+Tc1細胞いずれにおいてもIL-2の産生は見られなかった（図2）。

【0051】

なお、比較対照のWT 1特異的TCR遺伝子を導入していないコントロールTh1細胞とコントロールTc1細胞では、WT 1ペプチドをパルスLCL細胞との共培養によってIFN- γ 、IL-2ともに産生は見られなかった（図1、2）。

【0052】

^{51}Cr 標識したWT 1ペプチドをパルスしたLCL細胞を標的細胞として、精製したWT 1-A24 TCR+Th1細胞またはWT 1-A24 TCR+Tc1細胞の細胞傷害活性を4時間の ^{51}Cr リリースアッセイにて測定した。また比較対照としてのWT 1特異的TCR遺伝子を導入していないコントロールTh1細胞とコントロールTc1細胞の細胞傷害活性の測定も行った。

【0053】

その結果、WT 1-A24 TCR+Th1細胞では細胞傷害活性を示したが、コントロールTh1細胞では細胞傷害活性を示さなかった。また、WT 1-A24 TCR+Tc1細胞ではWT 1-A24 TCR+Th1細胞と比べて非常に強い細胞傷害活性を示したが、コントロールTc1細胞では細胞傷害活性を示さなかった。（図3）

【0054】

以上の結果より、非特異的な抗腫瘍活性をもつTc1細胞に腫瘍特異的TCR遺伝子を導入することにより、腫瘍細胞を特異的に傷害しうる細胞に加工できることが示された。また、非特異的に活性化したMHCクラスII拘束性のTh1細胞に、MHCクラスI拘束性の抗原特異的CTLより得られたTCR遺伝子を導入することにより、MHCクラスI分子／抗原ペプチド複合体と反応できるヘルパー活性さらには抗腫瘍活性を有する細胞に加工できることが示された。

【図面の簡単な説明】

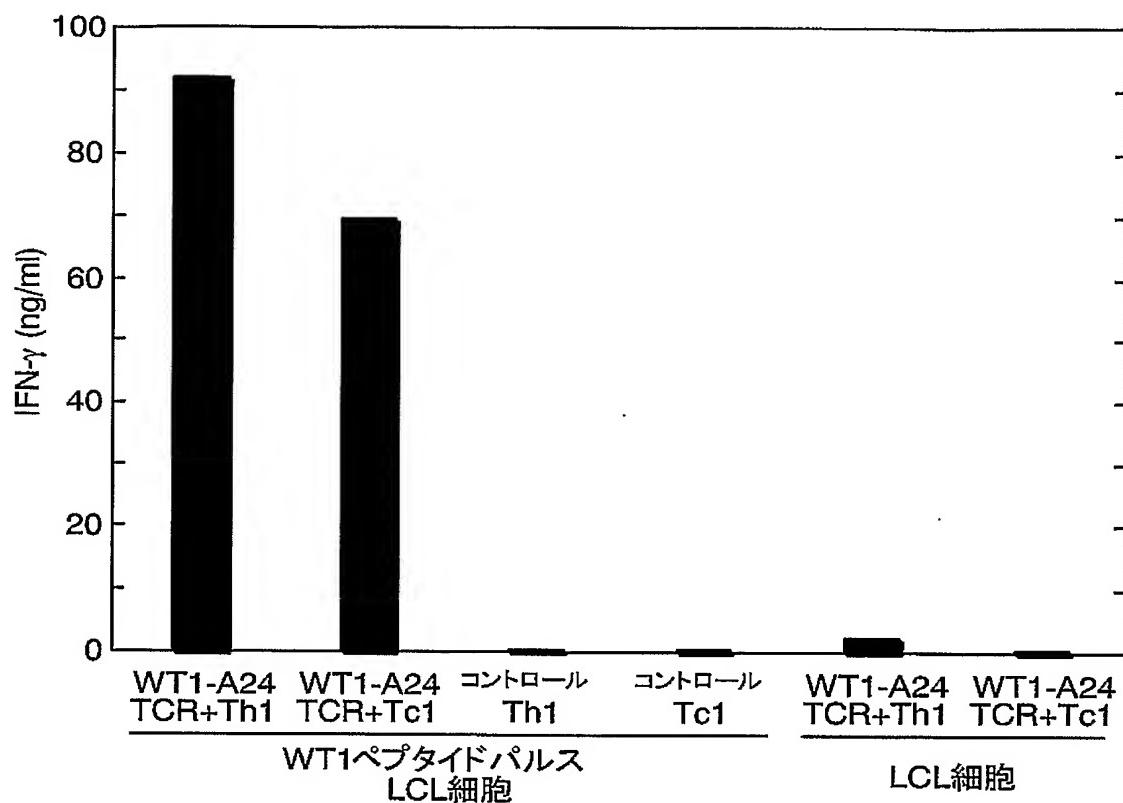
【0055】

【図1】WT 1ペプチドをパルスしたLCL細胞またはペプチドをパルスしないLCL細胞との共培養によるWT 1-A24 TCR+Th1細胞とWT 1-A24 TCR+Tc1細胞のIFN- γ 産生能の比較

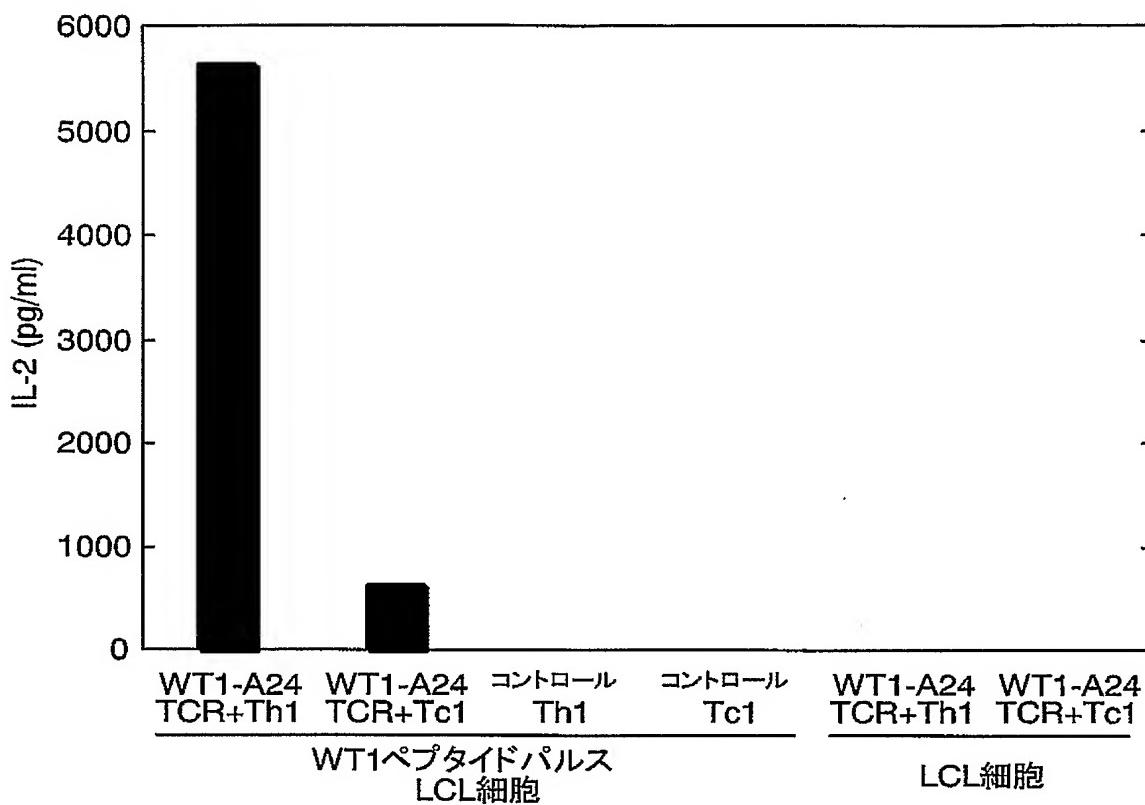
【図2】WT 1ペプチドをパルスしたLCL細胞またはペプチドをパルスしないLCL細胞との共培養によるWT 1-A24 TCR+Th1細胞とWT 1-A24 TCR+Tc1細胞のIL-2産生能の比較

【図3】WT 1-A24 TCR+Th1細胞とWT 1-A24 TCR+Tc1細胞のペプチドをパルスしたLCL細胞に対する細胞傷害活性

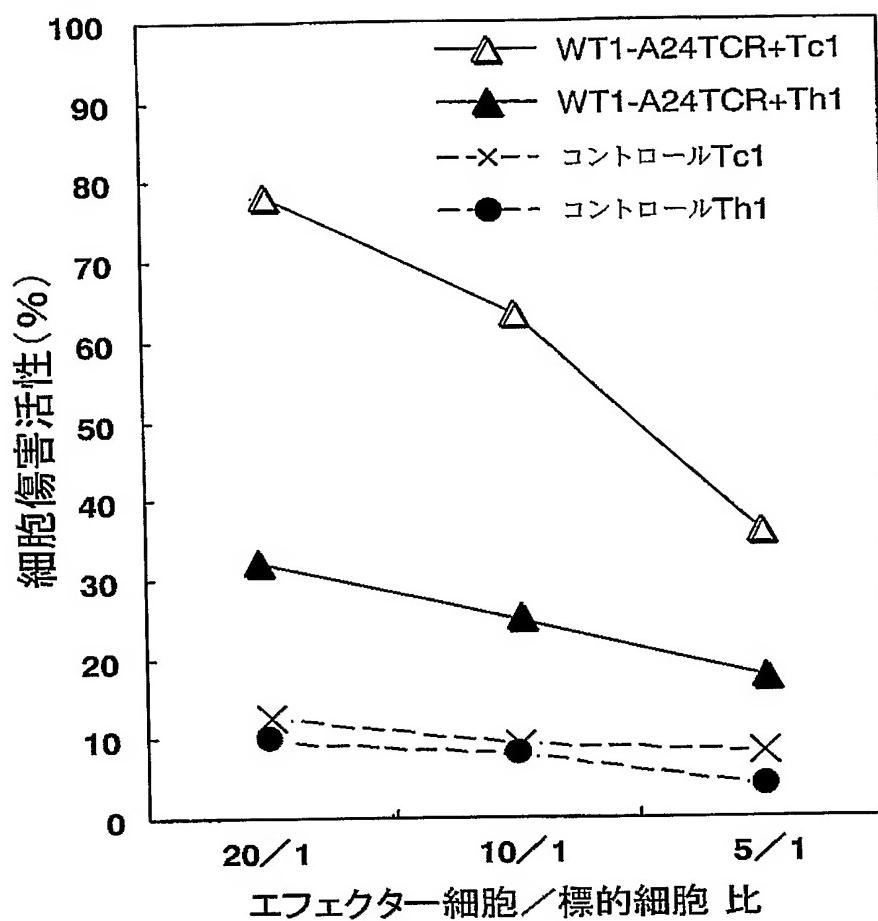
【書類名】 図面
【図 1】



【図2】



【図3】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 腫瘍特異的T細胞を製造するための新規な方法を提供すること。

【解決手段】 非特異的に活性化した抗腫瘍活性をもつT細胞に、腫瘍特異的CTLのTCR遺伝子を導入することにより、抗腫瘍活性をもつ腫瘍特異的T細胞を製造し、少量の血液からでも腫瘍特異的な細胞免疫治療法を可能にする。この方法によりMHCクラスI拘束性の腫瘍特異的Th細胞が得られ、MHCクラスI分子を発現する腫瘍細胞に反応して抗腫瘍活性およびヘルパー活性を示す細胞を製造することができる。

【選択図】図3

特願 2003-425009

出願人履歴情報

識別番号 [800000024]

1. 変更年月日 2000年 1月 6日

[変更理由] 新規登録

住所 北海道札幌市北区北7条西2丁目8番地1
氏名 北海道ティー・エル・オ一株式会社